



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

ISABELLA BONILHA DE OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE À INSULINA MIOCÁRDICA EM MODELOS
MURINOS DE CARDIOPATIA DIABÉTICA

*EVALUATION OF MYOCARDIAL INSULIN SENSITIVITY IN MURIN MODELS OF
DIABETIC CARDIOPATHY*

CAMPINAS
2019

ISABELLA BONILHA DE OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE À INSULINA MIOCÁRDICA EM MODELOS
MURINOS DE CARDIOPATIA DIABÉTICA

*EVALUATION OF MYOCARDIAL INSULIN SENSITIVITY IN MURIN MODELS OF
DIABETIC CARDIOPATHY*

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciências, área de
concentração Pesquisa Clínica.

*Thesis presented to the Faculty of Medical Sciences of State
University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for
Master degree in Sciences, Clinical Research Area.*

ORIENTADOR: PROFESSOR DOUTOR ANDREI CARVALHO SPOSITO

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA
ALUNA ISABELLA BONILHA DE OLIVEIRA,
E ORIENTADA PELO PROF. DR. ANDREI CARVALHO SPOSITO.

CAMPINAS
2019

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CNPq, 427224/2016-0
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5581-5763>

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Oliveira, Isabella Bonilha de, 1991-
OL4a Avaliação da sensibilidade à insulina miocárdica em modelos murinos de cardiopatia diabética / Isabella Bonilha de Oliveira. – Campinas, SP: [s.n.], 2019.

Orientador: Andrei Carvalho Sposito.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Resistência à insulina. 2. Diabetes mellitus tipo 2. 3. Dietas. 4. Ácidos graxos. 5. Frutose. I.Sposito, Andrei Carvalho, 1967-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of myocardial insulin sensitivity in murin models of diabetic cardiopathy

Palavras-chave em inglês:

Insulin resistance

Type 2 diabetes mellitus

Diets

Fatty acids

Fructose

Área de concentração: Pesquisa Clínica

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Andrei Carvalho Sposito [Orientador]

Antonio Carlos Boschiero

José Carlos Quinaglia e Silva

Data de defesa: 11-01-2019

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

ISABELLA BONILHA DE OLIVEIRA

ORIENTADOR: ANDREI CARVALHO SPOSITO

MEMBROS:

1. PROF. DR. ANDREI CARVALHO SPOSITO

2. PROF. DR. ANTONIO CARLOS BOSCHIERO

3. PROF. DR. JOSÉ CARLOS QUINAGLIA E SILVA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data: 11/01/2019

RESUMO

INTRODUÇÃO. A resistência insulínica (RI) no miocárdio é um mecanismo central no remodelamento fenotípico cardíaco no diabetes. Embora modelos de cardiopatia diabética em ratos tenham sido utilizados para descrever distúrbios com impacto fisiopatológico na doença cardiovascular, não há descrição do desenvolvimento de RI no tecido miocárdico e, portanto, de plausibilidade para interpretação dos efeitos cardíacos direto da RI. Assim, investigamos o desenvolvimento de RI miocárdica na dieta hiperlipídica (HFD), dieta rica em frutose (FRD) e no modelo poligênico Goto-Kakizaki (GK).

MÉTODOS. Ratos machos da linhagem Wistar com 6 semanas de idade foram divididos nos seguintes grupos: controle, HFD e FRD e receberam dieta convencional, dieta rica em ácidos graxos (31,2%) e caseína (20%) e dieta rica em frutose (47%), respectivamente. Ratos machos da linhagem Goto-Kakizaki foram investigados com 8 semanas de idade. Teste de tolerância à glicose (TTG) e teste de tolerância à insulina (TTI) foram medidos. Em seguida dois minutos após a injeção de insulina ou solução salina para avaliar as condições basais, coração, fígado e tecido adiposo epididimal foram removidos e investigados para caracterização da RI miocárdica.

RESULTADOS. Os animais HFD e FRD mostraram ganho de peso significativo em comparação com os animais do grupo controle. Como esperado, os ratos GK apresentaram menor ganho de peso que os animais controle. GTT revelou resistência periférica à insulina em ratos HFD, FRD e GK em comparação com ratos controle. Em concordância com estes dados, a ITT mostra que os grupos FRD e GK exibiram comprometimento da sensibilidade à insulina. A análise de transferência de Western da sinalização de insulina demonstrou resistência à insulina cardíaca apenas em ratos GK. Especificamente, a fosforilação de Akt na Ser473 mostrou resistência à insulina hepática nos grupos FRD e GK. Os ratos HFD e FRD também demonstraram um aumento atenuado da fosforilação da proteína Akt estimulada por insulina no tecido adiposo branco.

CONCLUSÃO. Em conclusão, apesar da tolerância à glicose sistêmica prejudicada, modelos baseados apenas em dieta exibiram sinalização de insulina cardíaca preservada. Em contraste, os ratos GK poligênicos demonstraram RI sistêmica e cardíaca.

ABSTRACT

INTRODUCTION. Insulin resistance (IR) in the myocardium is a central mechanism in cardiac phenotypic remodeling in diabetes. Although models of diabetic heart disease in rats have been used to describe disorders with pathophysiological impact on cardiovascular disease, there is no description of the development of IR in myocardial tissue and hence plausibility for interpretation of the direct cardiac effects of IR. Thus, we investigated the development of myocardial RI in the hyperlipid diet (HFD), high fructose diet (FRD) and the polygenic model Goto-Kakizaki.

METHODS. Male Wistar rats were divided into the following groups: control, HFD and FRD and received a conventional diet, diet rich in fatty acids (31.2%) and casein (20%) and a high fructose diet (47 %), respectively. Male rats of the Goto-Kakizaki strain were investigated at 8 weeks of age. Glucose tolerance test (GTT) and insulin tolerance test (ITT) were measured. After 2 minutes after the injection of insulin or saline to evaluate basal conditions, heart, liver and epididymal adipose tissue were removed and investigated for characterization of myocardial IR.

RESULTS. The HFD and FRD animals showed significant weight gain compared to control animals. As expected, GK mice had lower weight gain than control animals. TTG revealed peripheral insulin resistance in HFD, FRD and GK rats compared to control rats. In agreement with these data, TTI shows that the FRD and GK groups exhibited impaired insulin sensitivity. Western blot analysis of insulin signaling demonstrated cardiac insulin resistance only in GK rats. Specifically, Akt phosphorylation in Ser⁴⁷³ showed resistance to hepatic insulin in the FRD and GK groups. HFD and FRD rats also demonstrated an attenuated increase in the phosphorylation of the insulin-stimulated Akt protein in white adipose tissue.

CONCLUSION. In conclusion, despite impaired systemic glucose tolerance, diet-only models exhibited preserved cardiac insulin signaling. In contrast, polygenic GK rats demonstrated systemic and cardiac RI.

DEDICATÓRIA

A meus pais, Israel e Vera, que sempre me incentivaram para a realização dos meus objetivos, presentes nos momentos felizes e de dificuldades no meu mestrado, abrindo mão de minha presença em momentos importantes e me dando apoio sincero, incentivo e, principalmente, amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo presente da vida, por me proporcionar sabedoria e permitir que esse trabalho fosse desenvolvido.

A meus pais e ao meu irmão Luiz Augusto, por terem acompanhado toda minha trajetória acadêmica. Agradeço por toda palavra de incentivo, pelo apoio incondicional, por todo carinho e paciência. Obrigada por serem modelos de coragem. Amo muito vocês.

Ao meu namorado, Balila Anunciação, pela compreensão, ajuda, incentivo, apoio e companheirismo. Me incentivando com suas conquistas e, assim, caminhando juntos.

A meu caro orientador, professor Andrei Sposito, que me recebeu de modo muito carinhoso no laboratório. Muito obrigada pela partilha do saber, pelo apoio, pelas oportunidades, confiança e orientação exemplar. Acima de tudo, por incentivar e estimular meu interesse pelo conhecimento.

Agradeço aos técnicos responsáveis pelo laboratório de Técnica Cirúrgica da FCM, William Adalberto Silva, Miguel Luis Candido e Valdemir Benedito Costa pela imensa ajuda nos testes realizados nessa tese. Obrigada pelo conhecimento compartilhado e por todas as risadas e momentos descontraídos que tornaram os dias mais leves.

Meu agradecimento à Cristina Tanikawa, Daniela Diógenes e Camila Moreira que me ajudaram no decorrer desse estudo. Em conjunto agradeço ao professor Orlando Petrucci, por permitir a utilização do laboratório de isquemia e reperfusão do miocárdio.

Aos amigos do Aterolab e do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental, Vitor Virginio, Michele Santana, José Carlos, Joaquim Barreto, Helison do Carmo que estiveram ao meu lado durante a realização desta tese. Agradeço pelo companheirismo, força, amizade e apoio. Muito obrigada por tornarem a jornada desse mestrado muito mais divertida, alegre e leve...

Ao técnico Antônio e aos alunos do laboratório de fisiopatologia renal e investigação de complicações do Diabetes Mellitus pela utilização da fotodocumentadora.

Aos responsáveis pelo biotério, minha sincera gratidão.

Aos colaboradores da Universidade Cruzeiro do Sul, professor Rui Curi, professor Sandro Massao Hirabara e as alunas Joice Naiara Pereira e Tamires Serdan. Agradeço a atenção e colaboração com os animais.

Ao CNPq e Capes pelo apoio financeiro.

Meu eterno respeito a todos os animais que participaram deste trabalho.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	20
2.1	OBJETIVO GERAL	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3	METODOLOGIA	21
3.1	ANIMAIS E MODELOS EXPERIMENTAIS	21
3.2	COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	21
3.3	DELINEAMENTO DO ESTUDO	22
3.3.1	Teste de tolerância à glicose	22
3.3.2	Teste de tolerância à insulina	22
3.3.3	Sinalização da insulina no músculo cardíaco, fígado e tecido adiposo epididimal	23
3.3.4	Extração proteica dos tecidos	23
3.3.5	Immunoblotting	24
3.4	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	25
4	RESULTADOS	26
4.1	CAPÍTULO 1	27
5	DISCUSSÃO GERAL	48
6	CONCLUSÃO	51
7	REFERÊNCIAS	52
8	ANEXOS	56
	ANEXO 1 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS	56
	ANEXO 2 - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO	58

1 INTRODUÇÃO

O Diabetes *Mellitus* (DM) tem sido caracterizado como um distúrbio metabólico caracterizado pelo aumento da concentração de glicose plasmática, acarretando danos a longo prazo, disfunção e insuficiência de órgãos e tecidos, incluindo rins, coração e vasos sanguíneos (1-3). Segundo Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) 16 milhões de brasileiros sofrem de diabetes, isso nos mostra um crescimento de 61,8% nos últimos dez anos. Os indivíduos que são acometidos pela diabetes mellitus tipo 2 (DM2), doença caracterizada pelo aumento da glicemia como decorrência do aumento progressivo da resistência à insulina (RI) e incompetência pancreática para atender essa demanda excepcional das células β , apresentam risco aumentado de adquirir complicações macro e microvasculares graves, condições estas que se associam ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV).

O infarto agudo do miocárdio (IAM) corresponde por cerca de 60% dos óbitos em pacientes com DM2 (4, 5). Parte deste desfecho deve-se a alta prevalência de fatores de risco como sedentarismo e obesidade que em conjunto contribuem para a formação de placas ateroscleróticas com fenótipo instável. Em paralelo, além da propensão à ruptura de placa aterosclerótica e subsequente oclusão coronariana, a má adaptação do tecido miocárdico ao insulto isquêmico nos DM2, causa um aumento de letalidade nesses indivíduos que é 2 a 4 vezes maior que nos indivíduos sem DM2 (6). Em um contexto de condições patológicas associadas a distúrbios metabólicos, como hiperglicemia, aumento de níveis de ácidos graxos (AGL) e triacilgliceróis circulantes, hiperinsulinemia e aumento de citocinas inflamatórias, múltiplas vias moleculares no cardiomiócitos são alteradas comprometendo a contratilidade cardíaca e promovendo disfunção miocárdica e morte celular (7, 8).

O DM2 é a mais comum desordem metabólica crônica correspondendo de 90 a 95% de todos os casos de DM e sua prevalência vêm aumentando nos últimos anos. Segundo a Federação Internacional de Diabetes (IDF), no ano de 2014 o número de indivíduos com

diabetes era estimado em 387 milhões de pessoas no mundo. A projeção para ano de 2045, mostra que o número de indivíduos com DM2 terá subido para 629 milhões (9).

Essa desordem possui etiologia multifatorial, tendo a influência de fatores genéticos e ambientais (10). Estudos de genômica identificaram mais de 130 variantes genéticas associadas ao DM2, porém, essas variantes explicam menos de 15% de herança da doença (10). Além disso, fatores que envolvem o estilo de vida, como inatividade física, obesidade abdominal e excesso de adipocinas, proteínas sinalizadoras secretada pelo tecido adiposo, além de levar ao desenvolvimento de RI afetam a prevalência e a severidade do DM2 (11).

No desenvolvimento da DM2, o distúrbio principal e central se dá com a perda e disfunção da massa de células β -pancreáticas e uma combinação com RI periférica, levando à hiperglicemia (12). Nesses pacientes, pode-se observar uma redução da massa de células β em até 40-60% comparado com indivíduos saudáveis, ou seja, sem DM2 (13). Essa perda também tem sido atribuída ao aumento da apoptose (14). A primeira disfunção detectável é a RI no músculo, enquanto que alterações na secreção de insulina podem determinar hiperglicemia e início da terapia insulínica. Não obstante, paralelo a esses fatores ocorrem também hiperglucagonemia, aumento da produção hepática de glicose, aumento da lipólise e, como consequência, aumento de AGL circulantes (15).

Segundo as Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018, o diagnóstico de DM estabelecido ocorre de acordo com os seguintes critérios laboratoriais: quando a glicemia de jejum for $\geq 126\text{mg/dL}$, teste oral de tolerância a glicose (TOTG) for $\geq 200\text{mg/dL}$ e hemoglobina glicada (HbA1c) $\geq 6,5\%$.

Sinalização da insulina

A oxidação dos AGL é responsável por cerca de 60-90% da produção de energia miocárdica enquanto a oxidação da glicose corresponde pelos 10-40% restantes (16). Em condições de oferta e demanda de oxigênio a oxidação dos AGL resulta em três vezes mais

produção de ATP, em contrapartida, quando ocorre o suprimento de oxigênio, a glicólise é mais vantajosa porque pode ser oxidada em baixas concentrações de oxigênio ou mesmo anaerobicamente resultando em menor produção de ATP (17). A captação de glicose é, na sua maior parte, regulada pelo transportador de glicose (GLUT)1 e GLUT4, sendo este último o mais abundante nos cardiomiócitos (18). A insulina, importante hormônio polipeptídico, liberada pelas células β pancreáticas induz captação de glicose nos cardiomiócitos, músculo esquelético e tecido adiposo por ligação no seu receptor (IR).

O IR é uma glicoproteína heterotetramérica pertencente a uma subfamília de tirosina quinases receptoras, possui duas subunidades- α que são extracelulares e contém o domínio de ligação à insulina e duas subunidades- β transmembrana que possui domínios extra, trans e intracelular expressando atividade da tirosina quinase estimulada pela insulina (19). A insulina quando liga-se a subunidades- α causa subseqüentes mudanças conformacionais transmembrana e o receptor é autofosforilado em resíduos específicos de tirosina das subunidades- β . Em contraste com outros receptores tirosina quinases, o IR fosforila vários alvos intracelulares próximos que servem como locais de ancoragem para proteínas efetoras, incluindo os quatro membros da família do substrato do receptor de insulina (IRS) -1, 2, 3 e 4 (20). Dessa maneira, a ligação da insulina no seu receptor causa a translocação do substrato do IRS-1 para a membrana plasmática (21). Esse substrato quando fosforilado ativa a via de sinalização da fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K) / proteína quinase B (AKT), tornando possível a translocação do GLUT4 para a membrana celular facilitando a captação de glicose pela célula (Figura 1).

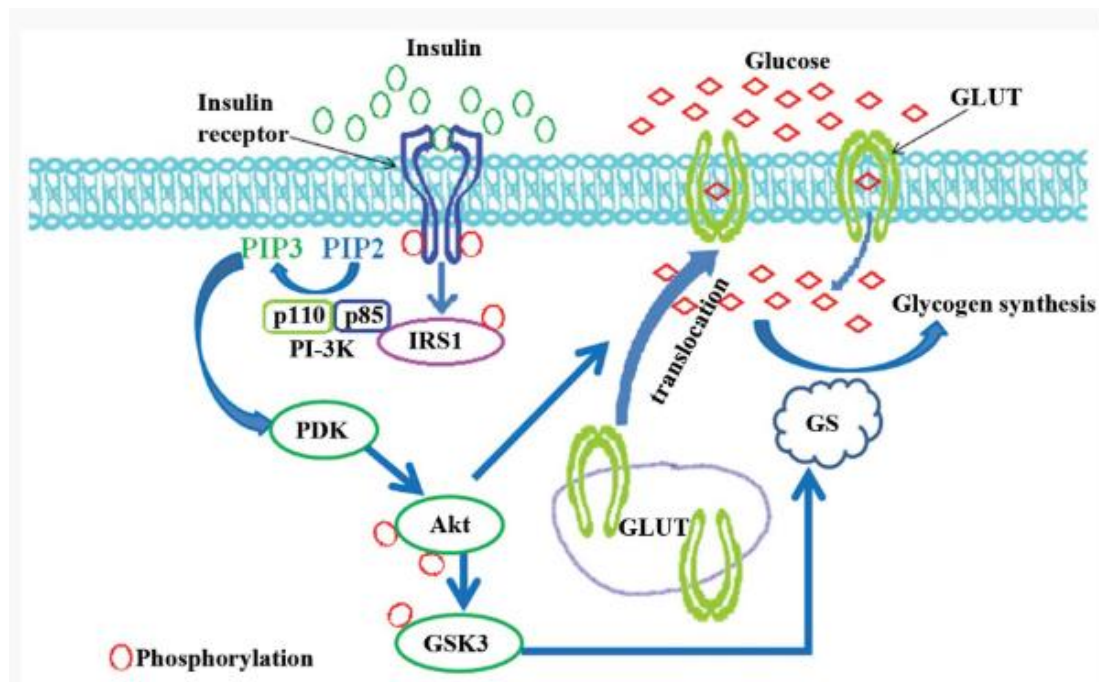


Figura 1: diagrama esquemático da via de sinalização da insulina e a regulação do transporte de glicose na célula (22).

Além da captação de glicose, a ativação das proteínas PI3K/AKT regula muitos processos como hipertrofia celular, geração de óxido nítrico (NO), apoptose e autofagia que contribuem para o aumento no risco de hipertrofia cardíaca, remodelamento ventricular esquerdo adverso ou insuficiência cardíaca (1). A sinalização da insulina também pode ocorrer através da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), contribuindo para o crescimento e remodelamento celular.

Resistência à insulina

A RI é considerada o principal efeito subjacente ao desenvolvimento de DM2, sendo uma disfunção múltipla que implica na incapacidade de promover ações metabólicas que envolvem fígado, músculo esquelético e tecido adiposo que são os principais tecidos sensíveis à ação desse hormônio, de tal forma a causar um comprometimento da captação de glicose mediada nesses tecidos, supressão prejudicada da produção de glicose hepática e supressão prejudicada de lipólise (8). Comumente é associada com obesidade, hipertensão e DCV

precedendo DM2. A nível celular, os mecanismos moleculares que são a base para o desenvolvimento de RI devem-se a alterações nas vias de sinalização da insulina previamente citadas (23).

Resistência insulínica no coração

Indivíduos com RI implícita associada com tolerância à glicose diminuída também tem um elevado risco de aterosclerose e DAC (24). A mudança mais rápida e mais consistente que desenvolve no coração em modelos animais, na evolução da RI é a incompetência da insulina em aumentar o transporte de glicose. Essa mudança ocorre antes de qualquer defeito na capacidade da insulina de aumentar a sinalização PI3K/AKT e ocorre como consequência tanto da redução quanto da translocação alterada do GLUT4 (8). A fosforilação oxidativa prejudicada pode reduzir a função cardíaca pelo fornecimento insuficiente de ATP para os cardiomiócitos (18). Muitos mecanismos têm sido propostos por contribuírem para o aumento da vulnerabilidade do coração ao estado de RI como o aumento na utilização de AGL, capacidade oxidativa mitocondrial prejudicada, diminuição da eficiência cardíaca, estresse oxidativo, aumento da apoptose e fibrose miocárdica (25). O excesso de lipídios no coração produz uma forma de lipotoxicidade que é decorrente do acúmulo de intermediários lipídicos promovendo alterações morfológicas e comprometendo o desempenho cardíaco (8).

Resistência insulínica no tecido adiposo

O tecido adiposo é um órgão endócrino responsável pela secreção de várias adipocinas que estão envolvidas em muitos processos inflamatórios mas também na regulação metabólica (26). Sua principal função é estocar energia na forma de triglicérides e durante períodos de jejum e fome prolongada, liberar lipídios para atender a demanda de energia do corpo (27). A captação de glicose é em grande parte dependente da insulina e regulada por vias semelhantes às do músculo esquelético. Em indivíduos sensíveis a insulina, ele é responsável por apenas uma pequena porção de toda captação de glicose corporal, menos que 10%

aproximadamente. Embora pareça insignificante, um estudo envolvendo camundongos com redução seletiva do GLUT4 no tecido adiposo, demonstrou redução na captação de glicose estimulada por insulina e diminuição da supressão estimulada de glicose endógena (28).

Dessa forma, com a acumulação de gordura o risco de desenvolver RI e, como consequência, DM2 aumenta. A secreção de mediadores pró inflamatórios e diabetogênicos é um mecanismo importante pelo qual a inflamação no tecido adiposo prejudica a sinalização de insulina em outros tecidos e ativa vias pró inflamatórias em tecidos sensíveis à insulina (27).

Resistência insulínica no tecido hepático

O fígado é um importante órgão que desempenha função na regulação fisiológica da homeostase energética do corpo bem como na patogênese dos distúrbios metabólicos, como obesidade e DM2. É responsável por, aproximadamente, 90% da produção de glicose endógena desempenhando duas funções principais reguladas pela insulina e glucagon (i) armazenamento de glicose em glicogênio e, (ii) produção de glicose por glicogenólise e gliconeogênese, processos que mantêm a concentração plasmática de glicose (29).

A RI hepática é um dos principais determinantes da hiperglicemia de jejum, sendo o aumento da gliconeogênese hepática a causa imediata da hiperglicemia de jejum que define DM2. O efeito agudo direto da insulina sobre o metabolismo da glicose hepatocelular ocorre através da estimulação da síntese de glicogênio (30). A ativação da Akt é resultado de múltiplas entradas para regular o metabolismo da glicose e lipídios hepáticos, explicação de como a insulina suprime a produção hepática de glicose (31).

Dietas hiperlipídicas e hipercalóricas são comumente associadas na sociedade moderna sendo um fator que contribui para o desenvolvimento de várias condições patológicas. Dessa maneira, estratégias terapêuticas disponíveis para DM2 e RI estão associadas a problemas de eficácia inadequada e efeitos colaterais. Assim, vários modelos animais derivados espontaneamente ou induzidos por dieta, estresse ou substâncias químicas têm sido

desenvolvidas e estudadas para entender influências na ação da insulina, o que motivou a presente tese.

A dieta rica em ácidos graxos contribui para a elevação de AGL causando alterações cardíacas com efeitos diretos no coração ou indiretos como resultado da obesidade e patologias associadas, como por exemplo, DM (32). Desequilíbrios nutricionais resultantes da ingestão de alimentos gordurosos levam ao desenvolvimento de RI através da formação de metabólitos intermediários: diacilgliceróis (DAG) e ceramidas. Como consequência, os DAGs ativam membros da família da proteína quinase C (PKC) levando à ativação das quinases serina e treonina que prejudicam ainda mais a fosforilação da tirosina pelo IRS. Por outro lado, as ceramidas medeiam a ativação da proteína fosfatase A2 (PPA2), além de ativar vias inflamatórias incluindo quinase N-terminal C-Jun (JNK) e fator nuclear kappa B (NFκB) através da interação com o receptor TLR4 (toll-like 4) induzindo RI (21).

Além disso, a dieta rica em ácidos graxos desencadeia, em condições normais e patológicas, anormalidades mitocondriais cardíacas tanto funcionais quanto estruturais de maneira a promover o aumento dos poros de transição de permeabilidade mitocondrial (mPTP) (32, 33).

Nos últimos 30 anos, o aumento de 25% no consumo de frutose coincide com o aumento na prevalência de obesidade e, como consequência, com o risco de doenças cardiometabólicas, DM e distúrbios lipídicos (34). Evidências mostram que a relação entre a alta ingestão de açúcar e o aumento do risco de DM2 e DCV é independente do índice de massa corporal (IMC) (35). A frutose é um açúcar altamente lipogênico e estimula a síntese de triglicerídeos (TG) e AGL devido à sua via metabólica distinta da glicose. A maioria da frutose ingerida é metabolizada no fígado e convertida em gliceraldeído-3-fosfato, evitando a etapa de fosfofrutocinase controladora da taxa de metabolismo da glicose (36). O consumo de frutose é um fator potencial que induz a lipogênese hepática de novo, resultando em RI hepática (37).

Isto leva à deposição de triacilglicerol em diversos órgãos como tecido adiposo, fígado, coração entre outros que liberam mediadores inflamatórios, incluindo TNF- α . Este por sua vez, fosforila o IRS-1 no resíduo de serina em vez da tirosina, regulando negativamente a sinalização de insulina (21).

Os ratos da linhagem Goto-Kakizaki (GK) são espécies consanguíneas, não obesas e resistentes à insulina, produzidos por reprodução seletiva ao longo de muitas gerações de ratos Wistar (38) e desenvolvem espontaneamente hiperglicemia em jejum 2 a 4 semanas após o nascimento. Sendo, portanto, um modelo bem caracterizado e reconhecido de DM2 não obeso. O desenvolvimento de DM2 nesses animais é um processo complexo que inclui múltiplos estímulos que estão envolvidos na indução e propagação do DM2 (39). É observado nesses animais que a regulação anormal da glicose se desenvolve tanto pela secreção prejudicada de glicose quanto pela RI. No início, há uma tentativa das células β pancreáticas em compensar a RI liberando mais insulina, com o decorrer do tempo, esse mecanismo é insuficiente causando exaustão funcional das células (40). Essa característica de desenvolvimento se assemelha a situação humana, onde o indivíduo apresenta hiperinsulinemia por um período antes de exibir um estado hiperglicêmico (41).

O peso corporal do GK é em média 10-30% menor e o nível de glicose 50-55% maior que o do rato Wistar (controle) da mesma idade. Durante seu desenvolvimento fetal, vários loci suscetíveis são responsáveis pela codificação e transferência de comportamentos diabéticos responsáveis pela redução da massa celular pancreática que se mantem por toda vida adulta (39). Observa-se também nesses animais que o transporte de glicose estimulada pela insulina é defeituoso e os níveis de IRS-1 e GLUT4 estão diminuídos (42).

Dependendo do objetivo do estudo, a escolha do modelo animal deve ser considerada com cuidado uma vez que afeta os desfechos experimentais. Animais roedores são comumente utilizados em estudos que envolvem DCV uma vez que esses animais são de fácil

acesso e possuem facilidade de serem manipulados e abrigados, possuem pequeno tempo de gestação, permitindo desse modo experimentos envolvendo um determinado número de animais em pouco tempo permitindo atingir significância estatística.

Em nossa tese escolhemos trabalhar com ratos. Em modelos que envolvem DM, os modelos de ratos possuem maior relação com doenças humanas de importantes maneiras visto que é possível a inclusão de agentes ambientais (dietas) para modificar as vias de interesse. Além dos detalhes citados, os ratos possuem proximidade com seres humanos, portanto a fisiologia torna-se mais fácil de ser monitorada (43).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a existência de resistência à insulina no miocárdio em modelo de cardiopatia diabética murina genético (GK) e induzidos por dietas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i. Avaliar a sensibilidade à insulina nos modelos estudados por meio do TTG e TTI;
- ii. Analisar a sensibilidade à insulina específica nos tecidos hepático e tecido adiposo epididimal;

3 METODOLOGIA

3.1 MODELOS ANIMAIS

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar machos provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório – (CEMIB/UNICAMP). Os ratos da linhagem Goto-Kakizaki (GK) foram obtidos do Programa Interdisciplinar em Ciências da Saúde da Universidade Cruzeiro do Sul. Os animais foram mantidos a uma temperatura de $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ sob um ciclo de 12 horas de luz e 12 horas no escuro, tendo acesso livre a água e ração. Ratos Wistar machos foram mantidos com ração padrão Nuvilab CR-1 irradiada (Quimtia, S/A, Colombo, PR, Brasil) até completarem 6 semanas de idade. Em seguida, os animais foram divididos nos seguintes grupos: (i) dieta convencional (controle), (ii) dieta rica em ácidos graxos 31,2% de gordura e 20% caseína (HFD), (iii) dieta rica em frutose (FRD) (47% frutose) e (iv) modelo genético (GK). Ambas as dietas estavam comercialmente disponíveis (PragSoluções biociências, Jaú, São Paulo, Brasil). Os ratos Wistar receberam HFD durante 8 ou 14 semanas. Os animais do grupo FRD receberam a dieta durante 14 semanas. Os experimentos envolvendo animais GK foram conduzidos com 8 semanas de idade, tempo necessário para o desenvolvimento de resistência à insulina periférica. A massa corporal dos animais foi avaliada semanalmente em balança de precisão (Mettler Toledo PB001, Barueri, São Paulo, Brasil).

3.2 COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas (CEUA/UNICAMP) através do protocolo nº 4216-1 e 4216-1(A)/2017. Todos os animais receberam os cuidados de acordo com os procedimentos para o uso científico de animais editados pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e recomendações do *Committee on Care and Use of*

Laboratory Animals - Institute of Laboratory Animal Resources (ILAR) - National Research Council, United States.

3.3 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Para caracterizar resistência à insulina, todos os animais usados nesse estudo foram submetidos à testes que avaliam alterações no metabolismo da glicose, e dessa maneira, são realizados para diagnosticar resistência à insulina, DM2 e até mesmo disfunção das células β pancreáticas.

3.3.1 Teste de tolerância à glicose (TTG)

No TTG, os animais foram submetidos à um jejum de 12 horas colocados em gaiolas metabólicas, de maneira que cada animal tinha acesso apenas a água. Em seguida, foram pesados para o cálculo da dose de glicose. Inicialmente, uma amostra de sangue foi obtida da veia caudal do animal no tempo zero (basal) que determina glicemia de jejum. Logo após, os animais receberam uma injeção intraperitoneal de solução de glicose 50%, na dose de 1g/Kg. As amostras de sangue foram obtidas nos tempos seguintes à injeção de glicose 15, 30, 60 e 120 minutos utilizando um glicosímetro Abbott (Free Style Optium H, São Paulo, Brasil). Após o procedimento, os animais tiveram livre acesso a água e ração padrão ou dieta de acordo com o grupo que pertencia.

3.3.2 Teste de tolerância à insulina (TTI)

Respeitando um intervalo de dois dias após o TTG, os animais foram, novamente, submetidos à um jejum de 12 horas com livre acesso à água. Foram pesados para o cálculo da dose insulina previamente ao teste. Uma amostra de sangue foi obtida da veia caudal do animal no tempo zero (basal) determinando glicemia de jejum. Em seguida, os animais receberam injeção intraperitoneal de insulina na dose de 10UI/Kg. As amostras foram obtidas nos seguintes tempos após infusão de insulina 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos. A razão da constante

de decaimento da glicose (κ ITT) foi calculada com base na regressão linear das concentrações de glicose obtidas no tempo 0 e 25 minutos da curva de TTI. Logo após o teste os animais tiveram livre acesso a água e ração padrão ou dieta de acordo com o grupo que pertencia.

3.3.3 Sinalização da insulina no músculo cardíaco, fígado e tecido adiposo epididimal

Para investigar a sinalização de insulina no músculo cardíaco, fígado e tecido adiposo epididimal os animais foram, novamente, submetidos à um jejum de 12 horas colocados em gaiolas metabólicas com acesso livre a água. Os animais foram previamente pesados e anestesiados com tiopental sódico (80mg/Kg) através de uma administração intravenosa na veia caudal e, posteriormente, foi realizado botão anestésico com lidocaína (5mg/Kg) no local da incisão cirúrgica. Após estímulos para observação da indução anestésica, foi realizado uma tricotomia. A cavidade cervical foi então acessada para a exposição da veia jugular. Após a canulação da jugular, foi feita uma injeção de insulina na dose de 10UI/Kg ou de solução salina. A infusão de salina foi realizada para avaliação das condições basais em situação equiparável à condição após insulina. Dois minutos após a infusão o coração foi removido e na sequência fígado e tecido adiposo epididimal, foram rapidamente colocados em nitrogênio líquido e guardados em biofreezer -80°C até as análises moleculares para caracterização da resistência insulínica.

3.3.4 Extração proteica dos tecidos

Proteínas foram extraídas dos tecidos por maceração com a presença de nitrogênio líquido, para que as paredes e membranas celulares fossem rompidas. O macerado foi transferido para microtubos de 2mL contendo tampão RIPA (Tris HCl [pH 7,4] NaCl [5M], EDTA [0,5M] NP40 1%, Deoxycholate Na, SDS 10%, Triton 0,1% contendo inibidores de proteases e fosfatases [SigmaFAST™]). Os macerados foram centrifugados a 11.000 RPM, a 4°C durante 40 minutos. O sobrenadante foi coletado e alíquotas foram feitas e guardadas em biofreezer -80°C para análises por *western blotting*. A dosagem de proteínas foi realizada pelo

método de BCA usando o kit Pierce™ (Thermo Scientific™, Sinapse Biotecnologia, São Paulo, Brasil) no leitor de Elisa Epoch (Biotek Instruments, Winooski, USA).

3.3.5 Immunoblotting

As proteínas extraídas (40mcg) foram preparadas com Laemmli 4X e aquecidas em banho-maria 95°C por 5 minutos. Foram, em seguida, aplicadas em gel SDS-PAGE 10% de 1.0mm de espessura, delineado por um marcador de peso molecular da Thermo Scientific™. Foi realizado eletroforese em cuba Mini-PROTEAN II (BioRad®) com solução tampão de corrida previamente diluído. O SDS-PAGE foi submetido à 30mA mantendo, aproximadamente, 50V e depois à 20mA mantendo em torno de 80V. Após a eletroforese, as proteínas separadas foram transferidas para membrana de nitrocelulose utilizando equipamento Transblotter da Apelex, que foi mantido e voltagem constante de 50V por 2 horas. Após a transferência, as membranas foram incubadas em solução bloqueadora por 2 horas à temperatura ambiente, levadas com solução basal por 10 minutos e incubadas por 16 horas a 4°C com anticorpo primário. Após a lavagem das membranas com solução basal, foram incubadas em temperatura ambiente por 2 horas com anticorpo secundário. A visualização dos complexos imunes foi realizada com o sistema de detecção de quimiluminescência Super Signal® West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific Rockford, IL, USA). A intensidade de fluorescência foi quantificada por densitometria (Fotodocumentadora ImageQuant LAS 500, GE Healthcare, São Paulo, Brasil) e normalizada pela proteína total no caso de proteína fosforilada. Anticorpos primários Akt 1 (D-17) (Goat polyclonal, sc-7126, Santa Cruz Biotechnology), phospho Akt 1/2/3 (Ser 473) (Rabbit monoclonal, sc-7985R, Santa Cruz Biotechnology) foram utilizados. As bandas foram quantificadas utilizando o software ImageJ 1.50i. (National Institutes of Health, USA). Os resultados foram analisados comparando as bandas obtidas entre os diferentes grupos.

3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão (SD). Nos testes de tolerância à glicose e de tolerância à insulina, os dados entre os grupos foram analisados pela análise paramétrica do teste t de Student. SPSS 21.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) e o GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., California, USA) foram usados para analisar e apresentar os dados. Significância estatística foi definida como $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

Os resultados desta tese são apresentados por artigo submetido para publicação:

Insulin signaling discrepancy in experimental models of the diabetic rat heart.

4.1 CAPÍTULO 1

Insulin signaling discrepancy in experimental models of the diabetic rat heart.

Isabella Bonilha^{1*}, José Carlos de Lima-Júnior¹, Vitor Wilson de Moura Virginio¹, Helison R.P. do Carmo¹, Andrei C. Sposito¹

Running title: Insulin signaling in heart rat models

¹ Department of Cardiology, Faculty of Medical Science, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil

Address for correspondence

Professor Andrei C. Sposito

Cardiology Division, Faculty of Medical Sciences,

State University of Campinas (Unicamp),

13084-971, Campinas, Sao Paulo, Brazil.

Tel 55 19 3521 7098

Fax 55 19 3289 4107

Email: andreisposito@gmail.com

ABSTRACT

Background. Insulin resistance (IR) in the myocardium stands as a central mechanism in cardiac phenotypic remodeling in diabetes. Although diabetic heart disease models in rats have been used to investigate this cell signaling, there is no information on IR development on myocardial tissue. Hence, we investigated myocardial IR development in the high-fat diet (HFD), fructose-rich diet (FRD) and the polygenic Goto-Kakizaki model.

Methods. Male Wistar rats at 6 weeks of age were divided into following groups: control, HFD and FRD group and received conventional diet, diet rich in fatty acids (31.2%) and casein (20%) and high fructose diet (47%) respectively for 14 weeks. Male Goto-Kakizaki rats were investigated at 6 weeks of age. Glucose tolerance test (GTT) and insulin tolerance test (ITT) were measured and two minutes after insulin or saline injection, heart, liver and epididymal adipose tissue were removed and investigated for characterization of myocardial IR.

Results. HFD and FRD animals showed significant weight gain compared with control animals. On the other hand, as expected, GK rats showed lower weight gain than control animals. GTT revealed peripheral insulin resistance in HFD, FRD and GK rats compared with control rats. In concurrence with these data, ITT shows that FRD and GK groups exhibited impaired insulin sensitivity. Western blot analysis of insulin signaling demonstrated cardiac insulin resistance only in GK rats. Specifically, phosphorylation of Akt at Ser⁴⁷³ showed hepatic insulin resistance in FRD and GK groups. HFD and FRD rats also demonstrated blunted increase in white adipose tissue insulin-stimulated phosphorylation of Akt.

Conclusion. In conclusion, despite of impaired systemic glucose tolerance diet-based rat models of diabetes exhibited preserved cardiac insulin signaling. In contrast, polygenic GK rats demonstrated both systemic and cardiac IR.

INTRODUCTION

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) affects 425 million people worldwide and is a main driver for the development of cardiovascular disease (CVD)¹. In fact, over 80% of mortality in diabetic patients is due to CVD, which decreases life expectancy in 10 years for those manifesting T2DM². This strong interaction between T2DM and CVD results from accelerated atherogenesis but also from diabetic cardiomyopathy whose phenotype is mainly modulated by insulin signaling³. Indeed, the development of myocardial insulin resistance (RI) has a central role due to metabolic changes, mitochondrial dysfunction, increased oxidative stress and activation of proapoptotic pathway⁴⁻⁸. Altogether, these events contribute to higher rates of heart failure and cardiac death in T2DM population^{9,10}.

From the molecular point of view, insulin mediated activation of the AKT cascade promotes a shift in the balance of myocardial energy substrate by increasing glucose metabolism (glycolysis and glucose oxidation) and reducing the oxidation of fatty acids¹¹, which contribute to the cardiac adaptation to coronary hypoperfusion. In the same context, modulation of the Akt/mechanistic target of rapamycin (mTOR) cascade by insulin has an important structural role; while in the remote myocardium, mTORC1 activation contributes to ventricular remodeling, in the IRI region the inhibition of mTORC1 reduces the infarct mass by limiting the exaggerated activation of macro-autophagy, which in this case is maladaptive^{11,12}. In non-ischemic cardiac disease, AKT cascade hyperactivation may lead to pathologic cardiac hypertrophy and heart failure¹³. Consistently, the reduction of insulin or Akt signaling prevents heart failure in animal models of cardiac hypertrophy, suggesting a central role of insulin signaling in adverse cardiac remodeling¹³.

Animal models may contribute substantially to the understanding of end-organ long-term complications in diabetes. The use of small rodents has been preferred for lower maintenance costs, easier handling and lodging and short gestation time and life duration; features that make this model suitable for proof-of-concept and high-yield studies. Among rodent models, the rat's heart is ideal due to greater stability, higher cardiac size and lower heart rate making the monitoring more straightforward and more like the human heart. Although the intraperitoneal injection of streptozotocin plus a high-fat diet (HFD) is one of the most used rat models of diabetes¹⁴⁻¹⁶, the accelerated and marked loss of ventricular mass suggests the participation of streptozotocin in the myocardial lesion, precluding extrapolation of results to diabetic cardiomyopathy¹⁷. Diabetic rat model based on fructose-rich diet (FRD) have also been reported displaying an increased hepatic lipogenesis, visceral obesity, insulin resistance and upregulation of proinflammatory cytokines by adipose tissue¹⁸⁻²⁰. Alternatively, Goto Kakizaki

(GK) rat is a polygenic experimental model of non-obese T2DM obtained by repetition of selective breeding of Wistar rats intolerant to glucose²¹. The model presents hyperglycemia, increased hepatic glucose production, peripheral insulin resistance and insufficient insulin secretion²²; a phenotype that resulted from multiples small insertions and deletions²³.

Despite several studies using the above models, whether these rats develop or not IR in the myocardium remains untested what may generate a substantial misleading in terms of cell signaling pathways interpretation. In this sense, the present study intended to evaluate insulin signaling in the myocardium in these murine models of diabetic cardiomyopathy, thus establishing a basis for the design and understanding of the existing findings.

METHODS

Animals

Male adult Wistar rats, weighing 250–350g, were provided by the Multidisciplinary Center for Biological Research in the Laboratory Animal Science Area (CEMIB/UNICAMP). Goto Kakizaki (GK) rats were obtained from the Interdisciplinary Post-graduate Program in Health Sciences, Cruzeiro do Sul University. Rats were housed two per cage and maintained under a 12-h light:12-h dark cycle, constant temperature ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$), circulating air, and for all experimental conditions free access to water.

Experimental design was made to be consistent with the traditional models²⁴⁻²⁶. Briefly, Wistar rats had free access to food (Nuvilab CR-1, Quimtia, S/A, Colombo, PR, Brazil) until 6 weeks of age. After this period, the animals were fed ad libitum after divided in the following groups: (i) standard chow diet (control); (ii) high fat diet (HFD) (31,2% of fat and 20% of casein) and (iii) fructose diet (FRD) (47% of fructose). The HFD and FRD were commercially available (PragSoluções Biociências, Jaú, São Paulo, Brazil) and were administered during 14 weeks. Body mass was weakly accessed by a precision scale (Mettler Toledo PB001, Barueri, São Paulo, Brazil). The GK animals were fed with a standard chow diet during 8 weeks, time required for the development of peripheral insulin resistance²⁷. The protocol for these experiments was approved by the Ethical Committee (4216-1/2017) and complied with the international law for the protection of the animals. All efforts were made to minimize suffering.

Intraperitoneal glucose tolerance test

Intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) was assessed by single intraperitoneal injection of 50% glucose solution (1g/kg body weight) after 12h of fasting. Blood samples were collected from tail vein after 0, 15, 30, 60 and 120min²⁸⁻³⁰. Blood glucose concentrations were determined using glucose sensor Abbott (Free Style Optium H, São Paulo, Brazil).

Insulin tolerance test

Insulin tolerance test (ITT) was assessed by single intraperitoneal injection of insulin (0.1UI/kg body weight) after 12h of fasting. Blood samples were collected from tail vein after 0, 5, 10, 15, 20, 25 and 30min. Plasma glucose disappearance rate (κ ITT) were calculated from the linear regression of glucose levels obtained after 0 and 15min of the ITT curve³¹.

Insulin signaling in cardiac muscle, liver and adipose tissue

After 12h of fasting, rats were anesthetized with single intraperitoneal injection of sodium thiopental (80mg/kg) and lidocaine (5mg/kg). Cervical cavity was assessed for jugular vein exposure, which was cannulated and received either insulin (10UI/kg) or saline solution to

evaluate baseline conditions. After 2min, heart, liver and epididymis adipose tissue were excised and rapidly transferred to liquid nitrogen. Then the samples were stored in the -80°C biofreezer until molecular analysis ³².

Protein extraction

Proteins were extracted from tissues by homogenization with RIPA buffer containing Tris HCl (pH 7,4), NaCl (5M), EDTA (0,5M), NP40 1%, Deoxycholate Na, SDS 10%, Triton 0,1% and inhibitors of proteases and phosphatases (SigmaFAST™) using dispersing tube with rotor-stator element (T10 Ultra-Turrax ® IKA, USA). Next, homogenates underwent centrifugation at 11.000 RPM, at 4°C for 40 minutes and supernatant was collected for western blotting analysis. Protein dosage was made by BCA using the Pierce™ (Thermo Scientific™, Sinapse Biotecnologia, São Paulo, Brazil) kit with Elisa Epoch (Biotek Instruments, Winooski, USA) reader.

Western blot analysis

Proteins were separated by SDS-PAGE 10% in Mini-PROTEAN II (BioRad®) system. After electrophoresis, proteins were transferred to nitrocellulose membrane. The membrane was blocked with bovine serum albumins (BSA Sigma-Aldrich) protein for 2 hours and then incubated overnight at 4°C with primary antibodies. After washout of membrane with basal solution, they were incubated under room temperature for 2 hours with secondary antibodies. Visualization of immunocomplexes were made with chemiluminescent detection system Super Signal® West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific Rockford, IL, USA). Fluorescence intensity was quantified by Densitometry (ImageQuant LAS 500, GE Healthcare, São Paulo, Brazil) and normalized by total protein when phosphorylated protein was assessed. Primary antibodies Akt 1 (D-17) (Goat polyclonal, sc-7126, Santa Cruz Biotechnology, US), phosphor-Akt 1/2/3 (Ser473, rabbit monoclonal, sc-7985R, Santa Cruz Biotechnology, US), Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) (rabbit monoclonal, Cell Signaling, US), phosphor-MAPK (Thr202, Tyr204, rabbit monoclonal, Cell Signaling, US), mTOR (rabbit polyclonal, Cell Signaling, US), phosphor-mTOR (Ser2481, rabbit polyclonal, Cell Signaling, US), P70 S6 kinase (p70S6K) (rabbit polyclonal, Cell Signaling, US) and phosphor-p70S6K (Thr421, Ser424, rabbit polyclonal, Cell Signaling, US) were used. The protein expression level was quantified using software ImageJ version 1.50i. (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Statistical analysis

All results are expressed as mean \pm standard deviation (SD). The body weight difference between groups were analyzed using 2-way ANOVA with Bonferroni post-tests. In

the GTT and ITT experiments, the data between groups were analyzed by Student's t test for parametric analysis. The western blot data were analyzed using paired Student's test. SPSS 21.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) and GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., California, USA) were used to analyze and present the data. A p value<0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

As expected, HFD induced a high weight gain ($+184\pm38\%$) reaching an 20% difference at the 14th week when compared to controls (665 ± 75 vs. 555 ± 44 g; $p=0.005$). In line with previous studies³³, FRD induced a similar weight gain as compared with the control group (560 ± 48 ; $p=0.9026$) (Fig. 1A). Additionally, at the 8th week, GK rats had lower weight when compared to control group (288 ± 2.9 vs. 322 ± 7.0 g; $p<0.01$). (Fig. 1B).

Insulin sensitivity

According to the GTT data displayed in Fig. 2, blood glucose levels increased more in the HFD than in the control group at the 14th week of diet reaching significance after 30 minutes (250 ± 25 vs. 205 ± 19 mg/dL; $p=0.04$) and in the overall response (AUC 23984 ± 2686 vs. 19699 ± 2101 mg.min; $p=0.06$) (Fig. 2A). Likewise, the blood glucose elevation was higher in the FRD group when compared to control group after 15 minutes (304 ± 49 vs. 230 ± 23 mg/dL; $p=0.002$) and in the overall response (AUC 26092 ± 3736 vs. 19699 ± 2101 mg.min; $p=0.01$) (Fig. 2B). In the GK group, blood glucose levels started at higher levels from baseline even after 12-h fasting (161 ± 10 vs. 109 ± 11 mg/dL; $p=0.03$) and increased more than in the control (AUC 38873 ± 2906 vs. 17899 ± 5657 mg.min; $p=0.0001$) (Fig. 2C).

During ITT (Fig. 3), the reduction of glycaemia after insulin injection was similar in the HFD group at week 14 when compared to the control group (1697 ± 436 vs. 1522 ± 250 mg.min; $p=0.37$) (Fig. 3A). In contrast, the glycaemia decline was lower in the FRD group producing an AUC 40% higher than that of control group (2129 ± 457 vs. 1522 ± 250 mg.min; $p=0.003$) (Fig. 3B). In the GK rats, blood glucose concentration was kept elevated even after insulin injection reaching an AUC 51% higher than the control group (3336 ± 275 vs. 2208 ± 10 mg.min; $p=0.0001$) (Fig. 3C).

The plasma glucose disappearance rate was not different between HFD and control groups at the 14th week of diet (4.5 ± 1.0 vs. $5.0\pm0.5\%$ /min; $p=0.1978$, respectively) (Fig. 4A). In contrast, kITT was lower in both FRD group ($4.1\pm1.0\%$ /min; $p=0.033$) (Fig. 4B) and in the GK group ($3.0\pm0.3\%$ /min; $p=0.002$) (Fig. 4C) as compared with the control group (5.0 ± 0.5 vs. $4.1\pm1.0\%$ /min).

Tissue-specific insulin sensitivity

After 14 weeks myocardial, hepatic and epididymal adipose tissues were removed 2 minutes after intravenous administration of insulin or saline to evaluate insulin induced phosphorylation of Akt at Ser473, an activating residue. The pAkt/Akt ratio in hepatic tissue increased from saline to insulin in control (0.3 ± 0.17 to 1.46 ± 1.04 ; $p=0.033$) and HFD (0.24 ± 0.19 to 1.59 ± 1.12 ; $p=0.03$) but not in FRD (0.47 ± 0.74 to 0.69 ± 0.52 ; $p=0.53$) and GK

(0.28 ± 0.29 to 0.12 ± 0.16 ; $p=0.38$) (Fig. 5). In addition, as shown in figure 5, FRD and GK groups showed a decreased insulin-induced Akt phosphorylation compared with control. There was no difference in the ratio of pre and post-insulin Akt phosphorylation between HFD and control groups.

Insulin-stimulated activation of Akt in epididymal adipose tissue was found in control (0.02 ± 0.1 to 0.82 ± 0.46 ; $p=0.007$), HFD (0.03 ± 0.4 to 0.2 ± 0.17 ; $p=0.049$), FRD (0.18 ± 0.12 to 0.61 ± 0.16 ; $p=0.0001$) and GK (0.06 ± 0.2 to 0.84 ± 0.49 ; $p=0.021$) groups (Fig. 6). In general, there was a difference in the ratio of pre and post-insulin Akt phosphorylation between the control, HFD, FRD and GK groups (65 ± 45 vs. 26 ± 21 vs. 4 ± 1.6 vs. 15 ± 6 times; $p=0.003$, respectively). In a posteriori comparison by Bonferroni test FRD and control presented the only significant difference ($p=0.003$).

In myocardium, the pAkt/Akt ratio change from saline to insulin increased in the control (0.20 ± 0.12 to 0.57 ± 0.10 ; $p=0.001$), HFD (0.08 ± 0.05 to 0.54 ± 0.27 ; $p=0.019$) and FRD (0.28 ± 0.07 to 0.58 ± 0.09 ; $p<0.0001$). As shown in figure 7, GK group exhibited a decreased insulin-induced Akt phosphorylation compared with control. We found no change in pAkt/Akt ratio from saline to insulin in GK rats (0.50 ± 0.16 to 0.41 ± 0.33 ; $p=0.59$) (Fig. 7).

The pAkt/Akt ratio in hepatic tissue increased from saline to insulin in control (0.3 ± 0.17 to 1.46 ± 1.04 ; $p=0.033$) and HFD (0.24 ± 0.19 to 1.59 ± 1.12 ; $p=0.03$) but not in FRD (0.47 ± 0.74 to 0.69 ± 0.52 ; $p=0.53$) or GK (0.28 ± 0.29 to 0.12 ± 0.16 ; $p=0.38$) (Fig. 6). In the adipose tissue, pAkt/Akt ratio increased from saline to insulin in control (0.02 ± 0.01 to 0.82 ± 0.46 ; $p=0.007$), HFD (0.03 ± 0.04 to 0.20 ± 0.17 ; $p=0.049$), FRD (0.18 ± 0.12 to 0.61 ± 0.16 ; $p=0.0001$) and GK (0.06 ± 0.02 to 0.84 ± 0.49 ; $p=0.021$).

DISCUSSION

The use of rat's hearts has been a fundamental mainstay for understanding disease mechanisms and designing potential therapeutic interventions in cardiology. In diabetic cardiomyopathy, despite a large number of studies using these animal models, the comparative assessment of the insulin signaling in cardiomyocytes did not exist.

In line with the established concept, in the three models tested, we found significant hyperglycemia demonstrating the efficacy of the models in inducing T2DM. Comparatively, we observed a gradual elevation of glycemia between the HFD, FRD and GK models, and in the latter hyperglycemia was significant even during the fasting state. According to the ITT test, insulin sensitivity was lower in the FRD and GK models but similar between HFD and controls, despite significant weight gain in the HFD model. This finding is consistent with the substantial insulin reserve reported in Wistar rats, a feature that led to the use of streptozotocin as an adjuvant in the creation of the T2DM model in these animals³⁴. As mentioned above, in our study, we preferred to avoid the use of streptozotocin by the possibility that the pathogenesis of cardiomyocytes is related, at least in part, to a permanent toxic action of this drug¹⁷. In fact, there is evidence that streptozotocin may directly impair cardiac contractile function as a result of increased oxidative stress³⁵.

One variable that needs to be considered in the GTT and ITT protocols is the adjustment of the glucose and insulin doses that will be administered to the animals by body weight. In these models, weight gain is not necessarily proportional to the increase in insulin-sensitive tissues. Thus, adjustment for body weight may generate an overload of glucose or insulin leading to inaccuracy in both tests. It is well established that DH induces obesity and IR and the HFD model is widely used in studies involving the association of these diseases^{36,37}. Thus, the present finding should not be considered as definitive proof of model inefficiency regarding the generation of T2DM.

As commented above, insulin receptors are abundantly expressed in cardiomyocytes and their activation plays a key role in the regulation of the balance among energy metabolic substrates and the protein translation in response to stressors such as increased workload or ischemia¹³. Insulin action leads to the activation of 2 main signaling pathways: the Akt cascade and MAPK. In general, activation of the AKT promotes the translocation of GLUT4 transporters from intracellular compartments into the sarcolemma, thus favoring an increased glucose disposal and decreased fatty acid oxidation. Consistent with this concept and with the glucose homeostasis tests, we observed a reduction of Akt phosphorylation in hepatic tissue in the FRD and GK models and a smaller increase in Akt activation in the fatty tissue in FRD

group when compared with the counterparts. In the HFD animals however, we did not observe changes in Akt activation when compared to controls, either in hepatic or adipose tissue, suggesting that up to this level of weight gain the effect in these tissues is discrete or absent. In cardiac tissue, Akt activation by insulin was observed in all models but the GK rats, indicating the existence of cardiac-specific IR in this model. As mentioned above, several implications may stem from this finding from the regulation of the energy substrate balance to regulation of protein synthesis and catabolism in cardiomyocytes via mTORC1/ Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1 (ULK1) pathway^{11,12}.

In conclusion, our findings show that experimental models based on diets are not able to produce myocardial IR in Wistar rats. For this aim, GK rats stands as a feasible experimental model.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

FINANCIAL SUPPORT

This work was supported by a grant from the Brazilian National Research Council (CNPq) grant number 427224/2016-0.

REFERENCES

1. Alam U, Asghar O, Azmi S, Malik RA. General aspects of diabetes mellitus. *Handb Clin Neurol* 2014;126:211-22.
2. Wright AK, Kontopantelis E, Emsley R, et al. Life Expectancy and Cause-Specific Mortality in Type 2 Diabetes: A Population-Based Cohort Study Quantifying Relationships in Ethnic Subgroups. *Diabetes Care* 2017;40:338-45.
3. Seferovic PM, Paulus WJ. Clinical diabetic cardiomyopathy: a two-faced disease with restrictive and dilated phenotypes. *Eur Heart J* 2015;36:1718-27, 27a-27c.
4. Riehle C, Abel ED. Insulin Signaling and Heart Failure. *Circ Res* 2016;118:1151-69.
5. Nishida K, Otsu K. Inflammation and metabolic cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 2017;113:389-98.
6. Bugger H, Abel ED. Molecular mechanisms of diabetic cardiomyopathy. *Diabetologia* 2014;57:660-71.
7. Kosmala W, Sanders P, Marwick TH. Subclinical Myocardial Impairment in Metabolic Diseases. *JACC Cardiovasc Imaging* 2017;10:692-703.
8. Hunter WG, Kelly JP, McGarrah RW, 3rd, Kraus WE, Shah SH. Metabolic Dysfunction in Heart Failure: Diagnostic, Prognostic, and Pathophysiologic Insights From Metabolomic Profiling.

Curr Heart Fail Rep 2016;13:119-31.

9. Liu Z, Cao W. p38 mitogen-activated protein kinase: a critical node linking insulin resistance and cardiovascular diseases in type 2 diabetes mellitus. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2009;9:38-46.
10. Horwich TB, Fonarow GC. Glucose, obesity, metabolic syndrome, and diabetes relevance to incidence of heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2010;55:283-93.
11. Delbridge LM, Mellor KM, Taylor DJ, Gottlieb RA. Myocardial autophagic energy stress responses--macroautophagy, mitophagy, and glycophyagy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2015;308:H1194-204.
12. Riehle C, Abel ED. Insulin regulation of myocardial autophagy. *Circ J* 2014;78:2569-76.
13. Packer M. Potentiation of Insulin Signaling Contributes to Heart Failure in Type 2 Diabetes: A Hypothesis Supported by Both Mechanistic Studies and Clinical Trials. *JACC Basic Transl Sci* 2018;3:415-9.
14. Derkach KV, Bondareva VM, Moyseyuk IV, Shpakov AO. [The influence of two-month treatment with bromocryptine on activity of the adenylyl cyclase signaling system in the myocardium and testes of rats with type 2 diabetes mellitus]. *Tsitologiya* 2014;56:907-18.
15. Bhandari U, Kumar V, Kumar P, Tripathi CD, Khanna G. Protective effect of pioglitazone on cardiomyocyte apoptosis in low-dose streptozotocin & high-fat diet-induced type-2 diabetes in rats. *Indian J Med Res* 2015;142:598-605.
16. Nikoie R, Rajabi H, Gharakhanlu R, et al. Exercise-induced changes of MCT1 in cardiac and skeletal muscles of diabetic rats induced by high-fat diet and STZ. *J Physiol Biochem* 2013;69:865-77.
17. Camacho P, Fan H, Liu Z, He JQ. Small mammalian animal models of heart disease. *Am J Cardiovasc Dis* 2016;6:70-80.
18. Kolderup A, Svihus B. Fructose Metabolism and Relation to Atherosclerosis, Type 2 Diabetes, and Obesity. *J Nutr Metab* 2015;2015:823081.
19. Zhou L, Pan Y, Chonan R, et al. Mitigation of Insulin Resistance by Mangiferin in a Rat Model of Fructose-Induced Metabolic Syndrome Is Associated with Modulation of CD36 Redistribution in the Skeletal Muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 2016;356:74-84.
20. Velickovic N, Teofilovic A, Ilic D, et al. Modulation of hepatic inflammation and energy-sensing pathways in the rat liver by high-fructose diet and chronic stress. *Eur J Nutr* 2018.
21. Goto Y, Kakizaki M, Masaki N. Production of spontaneous diabetic rats by repetition of selective breeding. *Tohoku J Exp Med* 1976;119:85-90.
22. Picarel-Blanchot F, Berthelie C, Bailbe D, Portha B. Impaired insulin secretion and excessive hepatic glucose production are both early events in the diabetic GK rat. *Am J Physiol* 1996;271:E755-62.
23. Liu T, Li H, Ding G, et al. Comparative Genome of GK and Wistar Rats Reveals Genetic Basis of Type 2 Diabetes. *PLoS One* 2015;10:e0141859.

24. Lichtenstein AH, Schwab US. Relationship of dietary fat to glucose metabolism. *Atherosclerosis* 2000;150:227-43.
25. Ouwens DM, Diamant M, Fodor M, et al. Cardiac contractile dysfunction in insulin-resistant rats fed a high-fat diet is associated with elevated CD36-mediated fatty acid uptake and esterification. *Diabetologia* 2007;50:1938-48.
26. Hwang IS, Ho H, Hoffman BB, Reaven GM. Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Hypertension* 1987;10:512-6.
27. Portha B, Giroix MH, Tourrel-Cuzin C, Le-Stunff H, Movassat J. The GK rat: a prototype for the study of non-overweight type 2 diabetes. *Methods Mol Biol* 2012;933:125-59.
28. Antunes LC, Elkfury JL, Jornada MN, Foletto KC, Bertoluci MC. Validation of HOMA-IR in a model of insulin-resistance induced by a high-fat diet in Wistar rats. *Arch Endocrinol Metab* 2016;60:138-42.
29. Ye M, Huang R, Min Z, Zhang P, Wang T, Yu B. Comparison of the effect by which gastric plication and sleeve gastrectomy procedures alter metabolic and physical parameters in an obese type 2 diabetes rodent model. *Surg Obes Relat Dis* 2017.
30. Ulla A, Alam MA, Sikder B, et al. Supplementation of *Syzygium cumini* seed powder prevented obesity, glucose intolerance, hyperlipidemia and oxidative stress in high carbohydrate high fat diet induced obese rats. *BMC Complement Altern Med* 2017;17:289.
31. Vinue A, Gonzalez-Navarro H. Glucose and Insulin Tolerance Tests in the Mouse. *Methods Mol Biol* 2015;1339:247-54.
32. Miquet JG, Giani JF, Martinez CS, et al. Prolonged exposure to GH impairs insulin signaling in the heart. *J Mol Endocrinol* 2011;47:167-77.
33. Dupas J, Goanvec C, Feray A, et al. Progressive Induction of Type 2 Diabetes: Effects of a Reality-Like Fructose Enriched Diet in Young Wistar Rats. *PLoS One* 2016;11:e0146821.
34. Marques C, Meireles M, Norberto S, et al. High-fat diet-induced obesity Rat model: a comparison between Wistar and Sprague-Dawley Rat. *Adipocyte* 2016;5:11-21.
35. Wold LE, Ren J. Streptozotocin directly impairs cardiac contractile function in isolated ventricular myocytes via a p38 map kinase-dependent oxidative stress mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;318:1066-71.
36. Lackey DE, Lazaro RG, Li P, et al. The role of dietary fat in obesity-induced insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2016;311:E989-E97.
37. Darkhal P, Gao M, Ma Y, Liu D. Blocking high-fat diet-induced obesity, insulin resistance and fatty liver by overexpression of IL-13 gene in mice. *Int J Obes (Lond)* 2015;39:1292-9.

Figure legends

Fig 1. Body weight comparison between HFD, FRD and control groups (A). Body weight comparison between control group and GK (C). Studied group: control (n=7), HFD (n=7); FRD group (n=10) and GK (n=4).

Fig 2. Glycaemia measured during GTT (1g/kg) of HFD (A); GTT of FRD group (B); GTT of GK group (C). Studied group: control (n=7), HFD (n=7); FRD group (n=10) and GK (n=4).

Fig 3. Glycaemia measured during ITT of HFD group (A); ITT of FRD group (B); ITT of GK group (C). Studied group: control (n=7), HFD (n=7); FRD group (n=10) and GK (n=4).

Fig 4. Glucose decay rates (kITT). kITT results of HFD (A); kITT of FRD group (B); kITT of GK group (C). Studied groups: control (n=7), HFD (n=7); FRD group (n=10) and GK (n=2).

Fig 5. Quantification of pAkt and tAkt in hepatic tissue by WB. Results of control, HFD, FRD and GK groups. Studied groups: control saline solution (n=3), control insulin solution (n=3); HFD saline solution (n=3), HFD insulin solution (n=3); FRD group saline solution (n=3), FRD group insulin solution (n=3) and GK saline solution (n=3), GK insulin solution (n=3).

Fig 6. Quantification of pAkt and tAkt in epididymal adipose tissue by WB. Results of control, HFD, FRD and GK groups. Studied group: control saline solution (n=4), control insulin solution (n=4); HFD saline solution (n=6), HFD insulin solution (n=6); FRD group saline solution (n=6), FRD group insulin solution (n=6) and GK saline solution (n=5), GK insulin solution (n=5).

Fig 7. Quantification of pAkt and tAkt in myocardial tissue by WB. Result of control, HFD, FRD and GK groups. Studied group: control saline solution (n=4), control insulin solution (n=4); HFD saline solution (n=5), HFD insulin solution (n=6); FRD saline solution (n=6), FRD insulin solution (n=8) and GK saline solution (n=5), GK insulin solution (n=5).

Figure 1

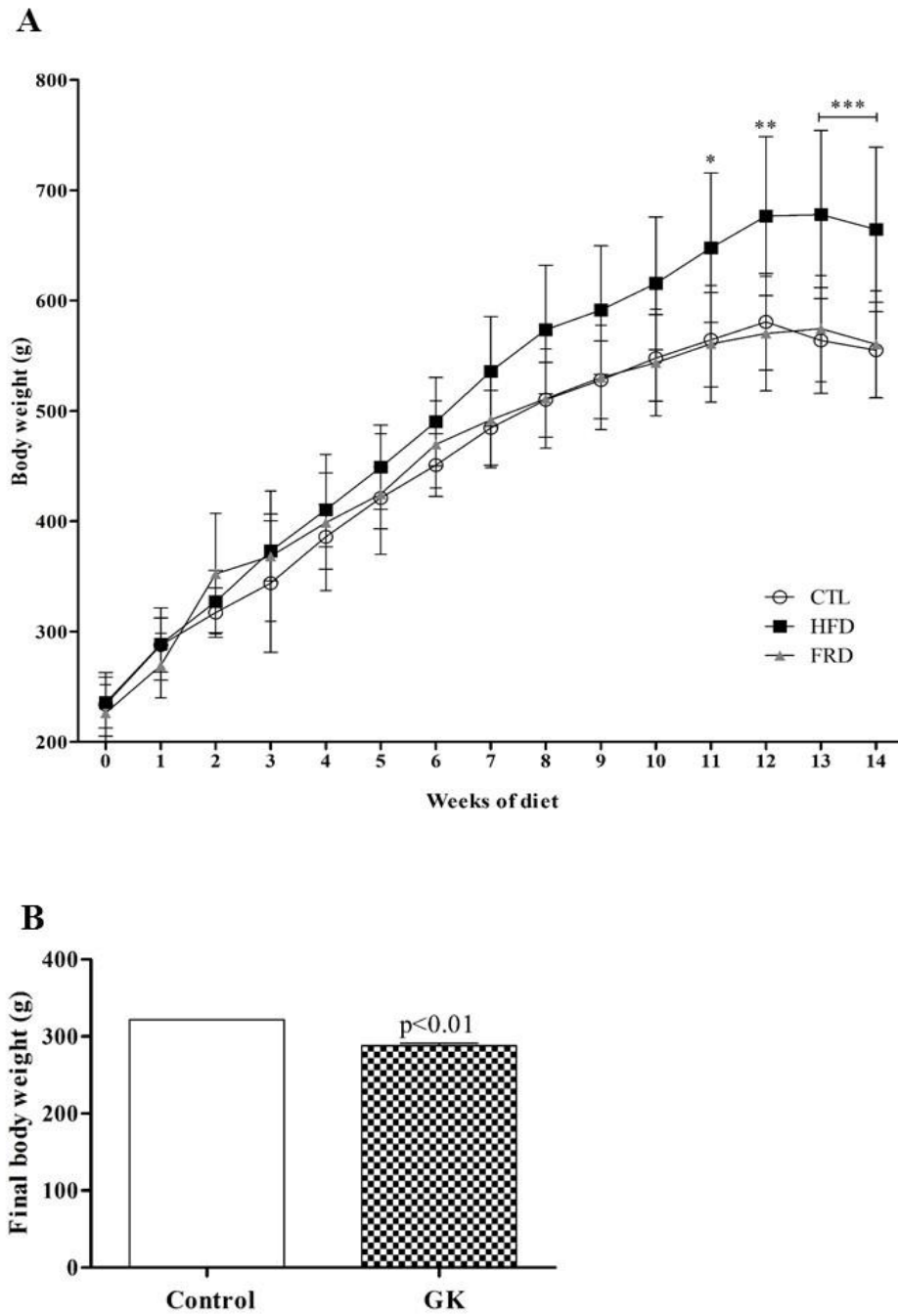


Figure 2

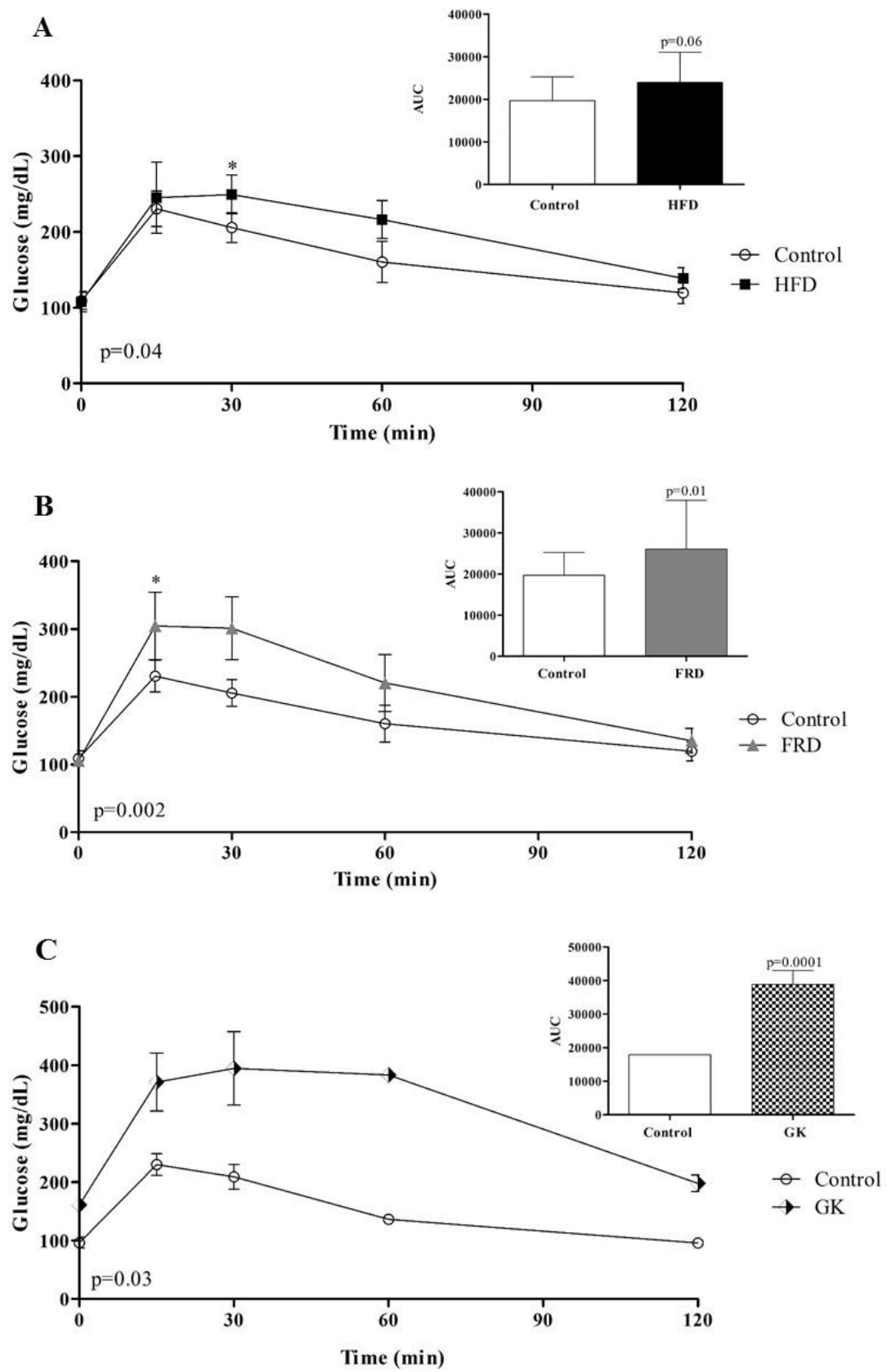


Figure 3

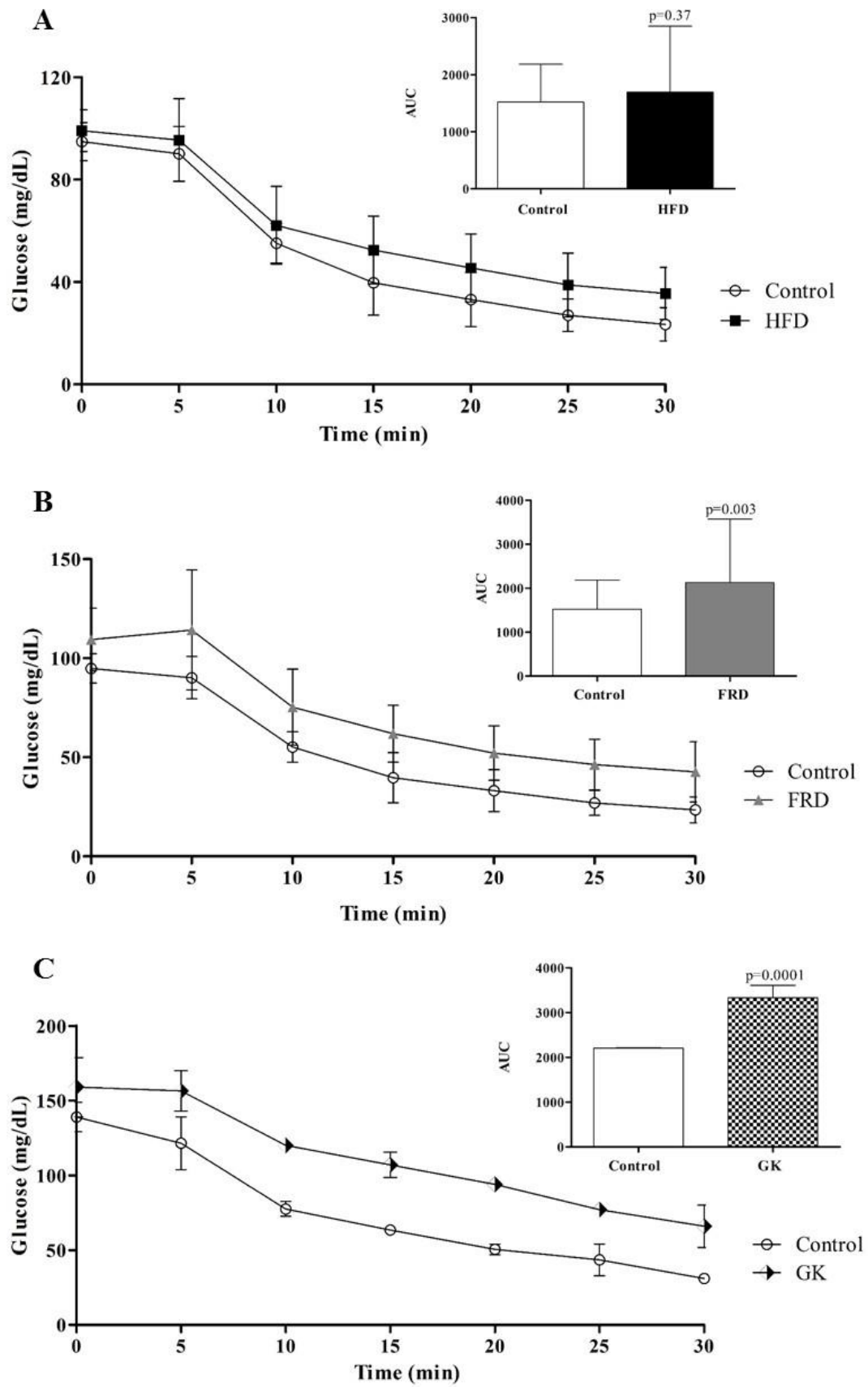


Figure 4

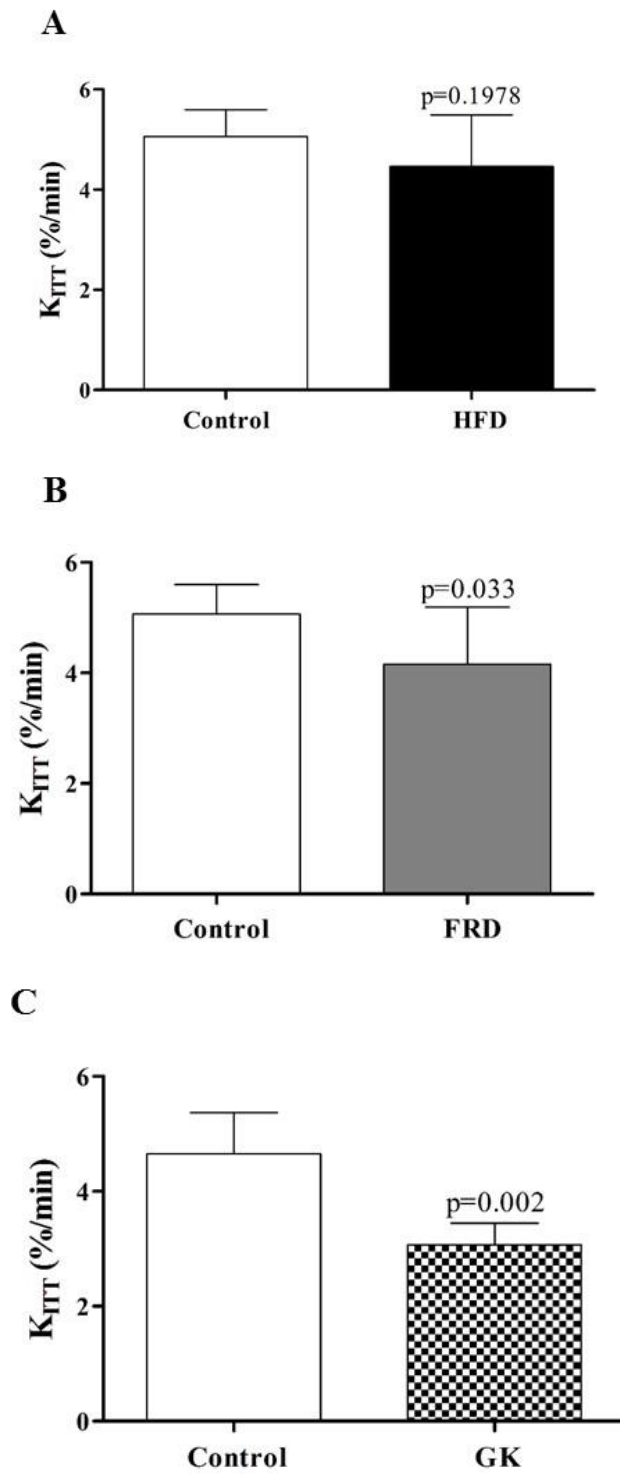


Figure 5

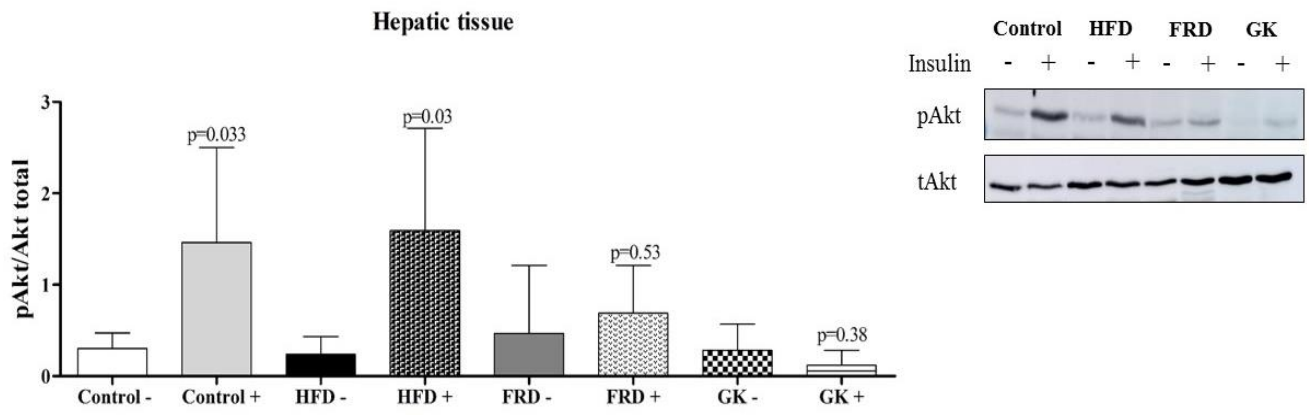


Figure 6

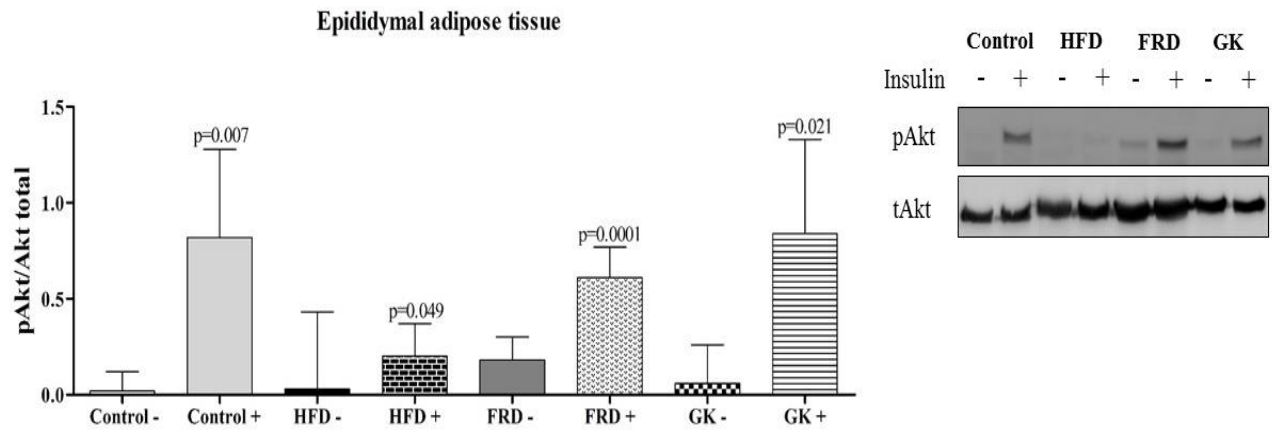
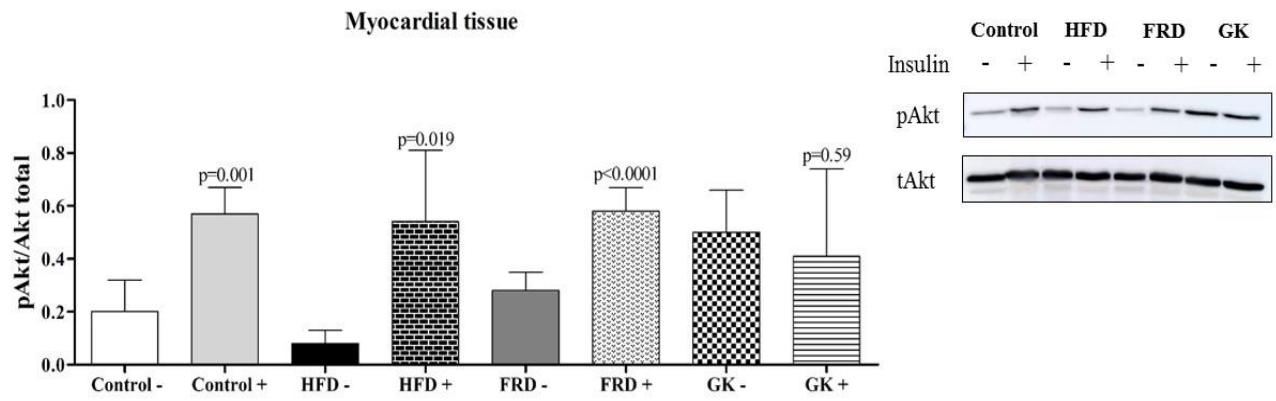


Figure 7



5 DISCUSSÃO GERAL

A presente Tese testou três modelos animais comumente usados para estudos envolvendo DM2 e DCV. O DM2 é uma doença com incidência globalmente elevada e que mantém perspectiva de aumento para os próximos anos. Por definição, a RI é um estado de resposta reduzida a níveis normais do mesmo hormônio (44). O pâncreas pode compensar a resposta reduzida à insulina com aumento da sua secreção, na tentativa de controlar a concentração de glicose no sangue. Dessa maneira a hipersecreção pode levar a falência das células β resultando em menor produção de insulina. O defeito na secreção de insulina é o fator central no desenvolvimento de DM2. Em indivíduos adultos, o aumento de 5% do peso está relacionado a um aumento de 20% no risco de RI, aproximadamente (45).

Na cardiomiopatia diabética, apesar de inúmeros estudos envolvendo corações de ratos, não existe evidências de similaridade entre esses modelos murinos e o coração humano. A maioria do conhecimento atual sobre os efeitos sistêmicos da RI foi obtida a partir de modelos animais submetidos a dietas específicas. Em alguns desses modelos, o padrão de desenvolvimento da doença não parece ser análogo à situação clínica em seres humanos, pois requerem doses de estreptozotocina (um antibiótico com propriedades diabetogênicas) sendo, portanto, uma hiperglicemia decorrente da destruição direta das células β pancreáticas resultando na deficiência de insulina (46, 47), um modelo com características de diabetes mellitus tipo 1 (DM1). Além desse fato, evidências também sugerem perda da função de contratilidade cardíaca, pela ação tóxica desta droga (43, 48), motivo pelo qual decidimos não utilizá-la na indução de RI nos animais utilizados nessa tese.

Na caracterização do fenótipo metabólico glicêmico, observamos uma glicemia elevada nos grupos HFD, FRD e GK. O TTG é um teste que não é capaz de distinguir entre a RI nos tecidos periféricos e capacidade reduzida das células β em produzir insulina (49). Dessa maneira, os animais do grupo HFD podem ter desenvolvido disfunção pancreática e não RI

conforme mostra os dados de TTI, pois observamos sensibilidade à insulina diminuída nos grupos FRD e GK mas não no HFD e controle. Uma possível explicação para isso seria a dose de glicose e insulina calculadas de acordo com o peso dos animais. A dieta hiperlipídica é amplamente associada ao ganho de peso, sabe-se que a obesidade confere risco associado à RI, entretanto, a maioria das pessoas que são obesas e não desenvolvem RI são compensadas pelo aumento na secreção de insulina (14). Kahn e seus colaboradores (50) demonstraram a relação entre a função das células β e a sensibilidade à insulina e que a constância do seu produto é de extrema importância para manter a tolerância à glicose. Dessa maneira, a sensibilidade à glicose prejudicada nas células pancreáticas é um preditor na progressão das mudanças na concentração plasmática de glicose independente da RI e um dos fenótipos presentes no DM2 (51).

A insulina é um importante hormônio com papel fundamental no crescimento e desenvolvimento celular e na homeostase da glicose, como previamente citado. Quando liga-se ao seu receptor, amplamente expresso no coração, exerce efeitos fisiológicos que envolvem a ativação de duas vias: (i) via das proteínas sinalizadoras PI3K/Akt que promove a translocação do GLUT4 para a membrana celular, e dessa maneira ocorre a captação de glicose nas células e redução da utilização de ácidos graxos; e (ii) a via da MAPK, a qual é responsável pela expressão de genes de proliferação e crescimento celular. No miocárdio, foi possível observar ativação da Akt em todos os modelos com exceção do grupo GK, indicando RI nos animais desta linhagem. Algumas quinases ativadas pela insulina, incluindo a alvo de rapamicina em mamíferos (mTOR) podem fosforilar o IRS-1 em resíduos específicos agindo desta maneira como um mecanismo de feedback negativo induzido pela insulina (52).

A desregulação da ação da insulina no tecido hepático e no tecido adiposo contribui para a elevação dos níveis de glicose no plasma. Observamos redução da razão pAkt/Akt nos grupos FRD e GK diferentemente do observado no grupo HFD. No tecido adiposo, um aumento pode ser observado nos grupos FRD e GK. A sinalização hepática de insulina prejudicada reduz

a síntese hepática de glicogênio. A inflamação e RI no tecido adiposo, por sua vez, promove aumento dos níveis de ácidos graxos, que como consequência, promove o aumento de gluconeogênese hepática.

Os nossos achados mostram que os modelos experimentais baseados em dietas não são capazes de desenvolver RI no miocárdio de ratos Wistar e que o melhor modelo para estudos de relação entre DM2 e DCV são os ratos da linhagem Goto-kakizaki. Cautela deve ser tomada na interpretação dos achados relacionados à cardiopatia diabética e DCV nesses modelos animais.

6 CONCLUSÕES

Muitos modelos animais de resistência à insulina exibem vários graus de obesidade ou DM. Além disso, alguns desses modelos também possuem a combinação de fatores de risco para doença cardíaca isquêmica. Embora esses modelos sejam úteis e considerados ferramentas essenciais de pesquisa, algumas limitações devem ser consideradas.

Com os modelos testados nessa tese podemos dizer que (i) embora a dieta hiperlipídica seja associada ao ganho de peso e também associada ao desenvolvimento de RI periférica, mesmo com 14 semanas de tratamento não induziu RI no miocárdio, (ii) o modelo de dieta rica em frutose independente de levar mudanças no peso corporal está mais relacionada a RI no tecido hepático, (iii) observamos que os animais da linhagem GK, por desenvolverem RI periférica com 8 semanas de vida, parecem ser o melhor modelo para os estudos envolvendo RI e DCV.

7 REFERÊNCIAS

1. Alam U, Asghar O, Azmi S, Malik RA. General aspects of diabetes mellitus. *Handb Clin Neurol*. 2014;126:211-22.
2. Rice Bradley BH. Dietary Fat and Risk for Type 2 Diabetes: a Review of Recent Research. *Curr Nutr Rep*. 2018.
3. American Diabetes A. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2012;35 Suppl 1:S64-71.
4. De Keyzer E, Kerkhove D, Van Camp G, De Sutter J, Achtergael W, Keymeulen B, et al. Screening for silent myocardial ischaemia in patients with type 2 diabetes mellitus: a quest to improve selection of the target screening population. *Acta Cardiol*. 2011;66(6):715-20.
5. Graca B, Donato P, Ferreira MJ, Castelo-Branco M, Caseiro-Alves F. Left ventricular diastolic function in type 2 diabetes mellitus and the association with coronary artery calcium score: a cardiac MRI study. *AJR Am J Roentgenol*. 2014;202(6):1207-14.
6. Figueiredo VN, Godoi FC, Martins NS, Quinaglia e Silva JC, Nadruz W, Jr., Coelho OR, et al. Diabetes mellitus unawareness is a strong determinant of mortality in patients manifesting myocardial infarction. *Curr Med Res Opin*. 2013;29(11):1423-7.
7. Bugger H, Abel ED. Molecular mechanisms of diabetic cardiomyopathy. *Diabetologia*. 2014;57(4):660-71.
8. Nishida K, Otsu K. Inflammation and metabolic cardiomyopathy. *Cardiovasc Res*. 2017;113(4):389-98.
9. Cho NH, Shaw JE, Karuranga S, Huang Y, da Rocha Fernandes JD, Ohlrogge AW, et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract*. 2018;138:271-81.
10. Skyler JS, Bakris GL, Bonifacio E, Darsow T, Eckel RH, Groop L, et al. Differentiation of Diabetes by Pathophysiology, Natural History, and Prognosis. *Diabetes*. 2017;66(2):241-55.
11. Tangvarasittichai S. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes*. 2015;6(3):456-80.
12. Prentki M, Nolan CJ. Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest*. 2006;116(7):1802-12.
13. Del Guerra S, Lupi R, Marselli L, Masini M, Bugliani M, Sbrana S, et al. Functional and molecular defects of pancreatic islets in human type 2 diabetes. *Diabetes*. 2005;54(3):727-35.
14. Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2003;52(1):102-10.
15. DeFronzo RA. Banting Lecture. From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes*. 2009;58(4):773-95.

16. Hunter WG, Kelly JP, McGarrah RW, 3rd, Kraus WE, Shah SH. Metabolic Dysfunction in Heart Failure: Diagnostic, Prognostic, and Pathophysiologic Insights From Metabolomic Profiling. *Curr Heart Fail Rep*. 2016;13(3):119-31.
17. Velez M, Kohli S, Sabbah HN. Animal models of insulin resistance and heart failure. *Heart Fail Rev*. 2014;19(1):1-13.
18. Neubauer S. The failing heart--an engine out of fuel. *N Engl J Med*. 2007;356(11):1140-51.
19. Bartolome A, Guillen C. Role of the mammalian target of rapamycin (mTOR) complexes in pancreatic beta-cell mass regulation. *Vitam Horm*. 2014;95:425-69.
20. Watson RT, Pessin JE. Intracellular organization of insulin signaling and GLUT4 translocation. *Recent Prog Horm Res*. 2001;56:175-93.
21. Sah SP, Singh B, Choudhary S, Kumar A. Animal models of insulin resistance: A review. *Pharmacol Rep*. 2016;68(6):1165-77.
22. Yu Y, Chai J. The function of miRNAs and their potential as therapeutic targets in burn-induced insulin resistance (review). *Int J Mol Med*. 2015;35(2):305-10.
23. Lee BC, Lee J. Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1842(3):446-62.
24. Nolan CJ, Ruderman NB, Kahn SE, Pedersen O, Prentki M. Insulin resistance as a physiological defense against metabolic stress: implications for the management of subsets of type 2 diabetes. *Diabetes*. 2015;64(3):673-86.
25. Riehle C, Abel ED. Insulin Signaling and Heart Failure. *Circ Res*. 2016;118(7):1151-69.
26. Greenberg AS, Obin MS. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. *Am J Clin Nutr*. 2006;83(2):461S-5S.
27. Bluher M. Adipose tissue inflammation: a cause or consequence of obesity-related insulin resistance? *Clin Sci (Lond)*. 2016;130(18):1603-14.
28. Abel ED, Peroni O, Kim JK, Kim YB, Boss O, Hadro E, et al. Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature*. 2001;409(6821):729-33.
29. Choukem SP, Gautier JF. How to measure hepatic insulin resistance? *Diabetes Metab*. 2008;34(6 Pt 2):664-73.
30. Petersen MC, Shulman GI. Roles of Diacylglycerols and Ceramides in Hepatic Insulin Resistance. *Trends Pharmacol Sci*. 2017;38(7):649-65.
31. Samuel VT, Shulman GI. The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux. *J Clin Invest*. 2016;126(1):12-22.
32. Littlejohns B, Pasdois P, Duggan S, Bond AR, Heesom K, Jackson CL, et al. Hearts from mice fed a non-obesogenic high-fat diet exhibit changes in their oxidative state, calcium and

- mitochondria in parallel with increased susceptibility to reperfusion injury. *PLoS One*. 2014;9(6):e100579.
33. Williamson CL, Dabkowski ER, Baseler WA, Croston TL, Alway SE, Hollander JM. Enhanced apoptotic propensity in diabetic cardiac mitochondria: influence of subcellular spatial location. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;298(2):H633-42.
 34. Crescenzo R, Bianco F, Mazzoli A, Giacco A, Liverini G, Iossa S. A possible link between hepatic mitochondrial dysfunction and diet-induced insulin resistance. *Eur J Nutr*. 2016;55(1):1-6.
 35. Malik VS, Popkin BM, Bray GA, Despres JP, Hu FB. Sugar-sweetened beverages, obesity, type 2 diabetes mellitus, and cardiovascular disease risk. *Circulation*. 2010;121(11):1356-64.
 36. Tsuchiya H, Ebata Y, Sakabe T, Hama S, Kogure K, Shiota G. High-fat, high-fructose diet induces hepatic iron overload via a hepcidin-independent mechanism prior to the onset of liver steatosis and insulin resistance in mice. *Metabolism*. 2013;62(1):62-9.
 37. Hsu MC, Wang ME, Jiang YF, Liu HC, Chen YC, Chiu CH. Long-term feeding of high-fat plus high-fructose diet induces isolated impaired glucose tolerance and skeletal muscle insulin resistance in miniature pigs. *Diabetol Metab Syndr*. 2017;9:81.
 38. Tourrel C, Bailbe D, Lacorne M, Meile MJ, Kergoat M, Portha B. Persistent improvement of type 2 diabetes in the Goto-Kakizaki rat model by expansion of the beta-cell mass during the prediabetic period with glucagon-like peptide-1 or exendin-4. *Diabetes*. 2002;51(5):1443-52.
 39. Akash MS, Rehman K, Chen S. Goto-Kakizaki rats: its suitability as non-obese diabetic animal model for spontaneous type 2 diabetes mellitus. *Curr Diabetes Rev*. 2013;9(5):387-96.
 40. Sarkozy M, Szucs G, Fekete V, Pipicz M, Eder K, Gaspar R, et al. Transcriptomic alterations in the heart of non-obese type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *Cardiovasc Diabetol*. 2016;15(1):110.
 41. Patel H, Giri P, Srinivas NR. Review of Pharmacokinetic Data of Different Drug Classes in Goto-Kakizaki Rats, a Non-obese Model for Type 2 Diabetes Mellitus: Case Studies and Perspectives. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 2017;42(2):173-82.
 42. Desrois M, Sidell RJ, Gauguier D, King LM, Radda GK, Clarke K. Initial steps of insulin signaling and glucose transport are defective in the type 2 diabetic rat heart. *Cardiovasc Res*. 2004;61(2):288-96.
 43. Camacho P, Fan H, Liu Z, He JQ. Small mammalian animal models of heart disease. *Am J Cardiovasc Dis*. 2016;6(3):70-80.
 44. Lebovitz HE. Insulin resistance: definition and consequences. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2001;109 Suppl 2:S135-48.

45. Golson ML, Misfeldt AA, Kopsombut UG, Petersen CP, Gannon M. High Fat Diet Regulation of beta-Cell Proliferation and beta-Cell Mass. *Open Endocrinol J.* 2010;4.
46. Derkach KV, Bondareva VM, Moyseyuk IV, Shpakov AO. [The influence of two-month treatment with bromocryptine on activity of the adenylyl cyclase signaling system in the myocardium and testes of rats with type 2 diabetes mellitus]. *Tsitologiya.* 2014;56(12):907-18.
47. Bhandari U, Kumar V, Kumar P, Tripathi CD, Khanna G. Protective effect of pioglitazone on cardiomyocyte apoptosis in low-dose streptozotocin & high-fat diet-induced type-2 diabetes in rats. *Indian J Med Res.* 2015;142(5):598-605.
48. Wold LE, Ren J. Streptozotocin directly impairs cardiac contractile function in isolated ventricular myocytes via a p38 map kinase-dependent oxidative stress mechanism. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;318(4):1066-71.
49. McGuinness OP, Ayala JE, Laughlin MR, Wasserman DH. NIH experiment in centralized mouse phenotyping: the Vanderbilt experience and recommendations for evaluating glucose homeostasis in the mouse. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009;297(4):E849-55.
50. Kahn SE, Prigeon RL, McCulloch DK, Boyko EJ, Bergman RN, Schwartz MW, et al. Quantification of the relationship between insulin sensitivity and beta-cell function in human subjects. Evidence for a hyperbolic function. *Diabetes.* 1993;42(11):1663-72.
51. Ferrannini E, Mari A. beta-Cell function in type 2 diabetes. *Metabolism.* 2014;63(10):1217-27.
52. Miquet JG, Giani JF, Martinez CS, Munoz MC, Gonzalez L, Sotelo AI, et al. Prolonged exposure to GH impairs insulin signaling in the heart. *J Mol Endocrinol.* 2011;47(2):167-77.

8 ANEXOS

ANEXO 1 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO (correção)

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado Avaliação da disfuncionalidade da HDL na proteção da lesão de isquemia e reperfusão no diabetes mellitus tipo 2 (protocolo CEUA/UNICAMP nº 4216-1), de responsabilidade do Prof. Dr. Andrei Carvalho Sposito e tem como executores Daniela Diogenes De Carvalho e Isabella Bonilha de Oliveira.

Este documento é válido apenas se apresentado junto com o certificado emitido originalmente pela CEUA/UNICAMP em 16/05/2016.

Campinas, 07 de julho de 2017.

Profa. Dra. Liana M. C. Verinaud
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva



CEUA/Unicamp

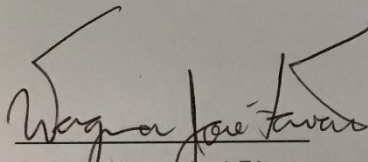
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

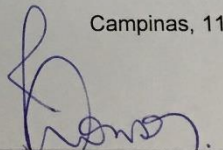
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado Avaliação da disfuncionalidade da HDL na proteção da lesão de isquemia e reperfusão no diabetes mellitus tipo 2 (protocolo CEUA/UNICAMP nº 4216-1(A)/2017), de responsabilidade do Prof. Dr. Andrei Carvalho Sposito e Isabella Bonilha de Oliveira, teve a solicitação de prorrogação aceita pela CEUA/UNICAMP:

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/08/2017-10/01/2020
Vigência da autorização para manipulação animal:	15/03/2015-10/01/2020
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib: WH (Wistar)
No. de animais:	30
Peso / Idade:	10 semanas / 350g
Sexo:	machos
Origem:	CEMIB/UNICAMP

Este documento é válido apenas se apresentado junto com o certificado emitido originalmente pela CEUA/UNICAMP em 07/07/2017.


Prof. Dr. Wagner José Fávaro
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

Campinas, 11 de outubro de 2017.

ANEXO 2 – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO

Prof. Sposito
andreisposito@gmail.com

RE: CIRCRES/2019/314874: Insulin signaling discrepancy in experimental models of the diabetic rat heart

Dear Dr. Sposito & Co-Authors:

This email is to acknowledge receipt of the above Regular Article manuscript for review by Circulation Research. You have received this email because you are listed as an author on this manuscript; if this is not correct, please contact the editorial office immediately.

If you are the submitting or corresponding author for this manuscript, please provide to the editorial office any of the items noted during submission, such as previously published Abstracts or In Press References, in PDF or Word file format, if you have not already done so.

We will be contacting you again once the editors have reached a decision on your submitted manuscript. If you have not been contacted within 72 hours after submission, it is safe to assume that your manuscript has been sent for full review.

If you should need to contact the editorial office, please include your manuscript number (CIRCRES/2019/314874) with all correspondence.

Thank you for your contribution to Circulation Research.

With thanks and best wishes,

Roberto Bolli, MD
Editor in Chief, Circulation Research
3355 Keswick Rd, Main Bldg 103
Baltimore, MD 21211 USA
CircRes@circresearch.org